

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071152006

UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

融合蛋白 anti-CD5/cSA 的基因构建、表达
纯化及其初步活性鉴定

Gene Construction, Expression and its Preliminary Activity
Identification of Fusion Protein anti-CD5/cSA

许 健

指导老师姓名: 颜江华 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交时间: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

学位授予时间: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

摘 要

在由双特异性抗体(Bispecific Antibody,BsAb)介导的CIK细胞过继性免疫治疗研究中,CD3 抗原常被选作为结合效应细胞的靶点,然而,CD3 抗体会促使效应细胞的过度活化进而引起其凋亡。已知 $CD3^+CD56^+$ 亚群是 CIK 细胞的主要效应细胞,此亚群的绝大部分细胞都高表达 CD5 抗原,因此,CD5 可以代替 CD3 作为 BsAb 的结合靶点。研究发现,抗 CD5 抗体结合 CD5 并不促使 CIK 细胞的过度活化和凋亡,因此,利用它发展的 BsAb 可望避免 CD3 抗体诱发的效应细胞过度活化和凋亡现象。本室已成功构建单链抗体(single-chain Fv,scFv)anti-CD5,但其只能与抗原呈单价结合且结合稳定性较差。为克服上述不足,本文通过基因工程技术将核心链霉亲和素(core streptavidin,cSA)连接在 anti-CD5 的 C-末端获得融合蛋白 anti-CD5/cSA,拟借助 cSA 的四聚化结构域形成同源多聚体的特性来提高 anti-CD5 与 CIK 细胞的结合能力。

我们利用 PCR 技术分别扩增获得 cSA 基因和 anti-CD5 基因,将 cSA 基因克隆至质粒 pET22b(+),获得 cSA/pET22 b(+);再将 anti-CD5 基因克隆至 cSA/pET22 b(+)获得重组质粒 anti-CD5/cSA/pET22 b(+),并转化至 *E.coli* BL21 (DE₃) 中,IPTG 诱导表达,优化 IPTG 诱导剂量和诱导时间,确定目的蛋白的高效表达条件。镍亲和层析柱纯化目的蛋白,并采用尿素梯度复性缓冲液透析复性。FITC 标记 anti-CD5/cSA 和 scFv anti-CD5;荧光显微镜分析融合蛋白 anti-CD5 组分的抗原反应性和特异性;流式细胞术实验比较融合蛋白 anti-CD5/cSA 和 scFv anti-CD5 与靶抗原的结合能力;竞争性 ELISA 和 Western blot 实验鉴定融合蛋白 cSA 组分结合生物素(Biotin)的能力。结果表明,我们获得序列正确的重组质粒 anti-CD5/cSA/pET22b(+),其在 *E.coli* BL21(DE₃)中主要以包涵体的形式高效表达;通过对诱导条件的改变,确定在终浓度为 0.4mmol/L 的 IPTG 诱导条件下,最适诱导时间为 5h;荧光显微镜和流式细胞术分析结果证明纯化复性后的蛋白能与 CIK 细胞产生特异性结合,且结合能力与 scFv anti-CD5 相比提高近 4 倍;竞争性 ELISA 实验结果表明纯化复性后的蛋白可竞争性抑制 HRP-Streptavidin 与 Biotin-BSA 的结合,当蛋白浓度为 200 μ g/mL 时,其抑制率达到 46.72%;Western blot 结果表明目的蛋白只有以四聚体复合物形式存在时才能与辣根过氧化物酶

标记的生物素有较好的结合反应，其二聚体复合物与单体均不能与生物素结合。

总之，我们通过基因工程技术成功表达了融合蛋白 anti-CD5/cSA，纯化复性后的蛋白具有结合 CIK 细胞和生物素的活性，且其结合 CIK 细胞的能力较 scFv anti-CD5 大为改善。因此，本文构建表达的融合蛋白 anti-CD5/cSA 为进一步探讨 BsAb 介导的细胞过继性免疫治疗研究奠定了基础。

关键词：CD5；核心链霉亲和素；融合蛋白

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

CD3 antigen is often chosen as a combined target on CIK cells(Cytokine-induced Killer Cells)in the BsAb-mediated adoptive immunotherapy. However, effector cells might be over activated by anti-CD3 antibody of BsAb and cause apoptosis. It is known that $CD3^+CD56^+$ sub-group of CIK cells are the main effector cells and the vast majority of this sub-group cells have high expression of CD5 antigen.Thus,CD5 can replace CD3 as the target. We have already gained the single-chain Fv (scFv)anti-CD5, but it can only bind with antigen in the form of univalent,so the binding ability is poor.To enhance the binding activity between scFv anti-CD5 and CIK cells, we try to prepare a new fusion protein by reconstruction of anti-CD5 gene and cSA gene and hope to improve the binding activity of anti-CD5 to CIK cells with the help of homologous tetramer forming induced by cSA.

Gene cSA and gene anti-CD5 were obtained by PCR.We inserted cSA gene into plasmid pET22 b(+) to construct recombinant plasmid cSA/pET22 b(+);then inserted anti-CD5 gene into cSA/pET22b(+) to construct recombinant plasmid anti-CD5/cSA-/pET22b(+).The recombinant plasmid anti-CD5/cSA/pET22b(+) was transformed into *E.coli* BL21 (DE₃) which expressed with high yield under optimal conditions.The fusion protein was purified through Nickel-affinity chromatography column and refolded by Gradient dialysis of urea.The anti-CD5/cSA and scFv anti-CD5 were labeled with FITC,then their antigen-binding activity and specificity were analyzed by fluorescence microscope,moreover,their binding ability to CIK cells were analyzed and compared by Flow Cytometry;the biotin-binding activity of anti-CD5/cSA was determinated by ELISA and Western blot.The results indicated that the recombinant plasmid anti-CD5/cSA/pET22b(+) with correct sequence was obtained and expressed in *E.coli* BL21(DE3) mainly in the form of inclusion bodies.After purified and refolded,fusion protein anti-CD5/cSA retained both antigen-binding activity of anti-CD5 component and biotin-binding activity of cSA component,furthermore, the avidity of anti-CD5/cSA to CIK cells was improved about 4 times comparing with scFv anti-CD5.

In conclusion,the fusion protein anti-CD5/cSA with binding activity of both CD5

antigen and biotin was successfully prepared through genetic engineering, and the binding ability of anti-CD5 to CIK cells was improved greatly. Therefore, the anti-CD5/cSA which we prepared would lay the foundation for further studies of BsAb-mediated cell adoptive immunotherapy.

Key words: CD5; Core-streptavidin; Fusion Protein

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

前言	1
一、 肿瘤的生物治疗	1
二、 CD5 抗原在肿瘤免疫治疗中的应用前景	15
三、 链霉亲和素/生物素系统在肿瘤免疫治疗中的应用	16
四、研究目的和内容	19
第一章 融合蛋白 anti-CD5/cSA 的基因构建及蛋白表达纯化	22
一、 材料和方法	22
1 材料	22
1.1 菌株及质粒	22
1.2 主要试剂及耗材	22
1.3 主要仪器及设备	23
1.4 主要溶液的配制	23
2 方法	26
2.1 anti-CD5/cSA 重组基因的设计	26
2.2 引物的合成	27
2.3 PCR 扩增 cSA 基因和 anti-CD5 基因	27
2.4 重组质粒的构建及其转化	28
2.5 重组子的筛选和序列分析	30
2.6 anti-CD5/cSA 在大肠杆菌中的诱导表达	32
2.7 融合蛋白 anti-CD5/cSA 的纯化和复性	33
二、结果与分析	35
1 理论设计的 anti-CD5/cSA 基因核苷酸序列	35
2 PCR 扩增 cSA 基因和 anti-CD5 基因	36
3 重组质粒的筛选和序列分析	37
4 anti-CD5/cSA 在大肠杆菌中的诱导表达	42
5 融合蛋白 anti-CD5/cSA 的高效表达和纯化复性	44
6 蛋白浓度的测定	45
三、讨论	45

第二章 融合蛋白 anti-CD5/cSA 的初步活性鉴定	49
一、 材料和方法	49
1 材料.....	49
1.1 细胞株.....	49
1.2 主要试剂及耗材.....	49
1.3 主要仪器及设备.....	49
1.4 主要溶液的配制.....	50
2 方法.....	52
2.1 融合蛋白 anti-CD5 组分的活性鉴定.....	52
2.1.1 细胞培养.....	52
2.1.2 免疫荧光实验分析.....	52
2.1.3 流式细胞术实验分析.....	54
2.1.4 Western blot 实验分析	54
2.2 融合蛋白 cSA 组分的活性鉴定.....	54
2.2.1 竞争性 ELISA 实验分析	54
2.2.2 Western blot 实验分析	55
二、 结果与分析	55
1 融合蛋白 anti-CD5 组分的活性鉴定.....	55
1.1 免疫荧光实验结果.....	55
1.1.1 融合蛋白 anti-CD5/cSA 和 scFv anti-CD5 的 FITC 标记.....	55
1.1.2 FITC-anti-CD5/cSA 对两种细胞的荧光染色实验结果.....	55
1.2 流式细胞术实验结果.....	57
1.2.1 anti-CD5/cSA 结合靶细胞的抗原反应性和特异性分析.....	57
1.2.2 anti-CD5/cSA 和 scFv anti-CD5 结合 CIK 能力的比较	58
1.3 Western blot 实验结果	58
2 融合蛋白 cSA 组分的活性鉴定.....	59
2.1 竞争性 ELISA 实验分析融合蛋白 cSA 组分的活性	59
2.2 Western blot 分析融合蛋白 cSA 组分的活性	59
三、 讨论	60

总结.....	63
参考文献	64
致谢.....	70

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Introduction	1
I Biotherapy of malignant tumor	1
II CD5 antigen and its' application prospect in cancer immunotherapy	15
III The application of Streptavidin/biotin in cancer immunotherapy	16
IV The purpose and content of this thesis	19
Chapter I Gene construction and expression of fusion protein anti-CD5/cSA.....	22
I Materials and methods.....	22
1 Materials	22
1.1 Bacterium strains and vectors	22
1.2 Reagents.....	22
1.3 Main instruments	23
1.4 Main solutions.....	23
2 Methods.....	26
2.1 Design of recombination gene anti-CD5/cSA	26
2.2 Synthesis of primers.....	27
2.3 Construction of genes	27
2.4 Construction of recombinant plasmids and their transformation	28
2.5 Screening of recombinants and analysis of sequences	30
2.6 Expression of fusion protein anti-CD5/cSA in <i>E.coli</i>	32
2.7 Purification and renaturation of fusion protein.....	33
II Results and analyses	35
1 The designed DNA sequence of anti-CD5/cSA.....	35
2 The amplification of cSA gene and anti-CD5 gene	36
3 Screening of recombinants and analysis of sequences	37
4 Expression of fusion protein anti-CD5/cSA	42
5 Expression and purification of fusion protein with high yield	44
6 Calculation of fusion protein's concentration.....	45
III Discussion.....	45
Chapter II The preliminary activity analyses of anti-CD5/cSA....	49
I Materials and methods.....	49

1	Materials	49
1.1	Cell lines	49
1.2	Reagents.....	49
1.3	Main instruments	49
1.4	Main solutions.....	50
2	Methods.....	52
2.1	Activity analyses of anti-CD5 component	52
2.1.1	Cell cultures	52
2.1.2	Activity analysis by Fluorescence Microscope.....	52
2.1.3	Activity analysis by Flow Cytometry	54
2.1.4	Activity analysis by Western blot	54
2.2	Activity analyses of cSA component	54
2.2.1	Activity analysis by competitive ELISA	54
2.2.2	Activity analysis by Western blot	55
II	Results and analyses	55
1	Activity analyses of anti-CD5 component in anti-CD5/cSA.....	55
1.1	Experimental results of Fluorescence Microscope	55
1.1.1	Anti-CD5/cSA and scFv anti-CD5 labeled with FITC	55
1.1.2	The results of cells labeled with FITC-anti-CD5/cSA	55
1.2	Experimental results of Flow Cytometry.....	57
1.2.1	Analyses of antigen-binding activity and specificity	57
1.2.2	Comparison results of binding ability to CIK cells between anti-CD5/cSA and scFv anti-CD5.....	58
1.3	Experimental results of Western blot	58
2	Activity analyses of cSA component in anti-CD5/cSA	59
2.1	Experimental results of competitive ELISA.....	59
2.2	Experimental results of Western blot.....	59
III	Discussion.....	60
	Conclusion	63
	References.....	64
	Acknowledgments	70

前言

一、肿瘤的生物治疗

目前,恶性肿瘤(简称癌症)仍然是威胁人类生命健康的主要疾病。根据WHO公布的统计数据,全球每年约有1200万人被确诊为癌症,760万人死于癌症,而且癌症的发病率还在不断上升,预计2030年全世界将有2600万新增病例,死亡人数达到1700万人,其中大多数将发生在中低收入的发展中国家。人类健康面对严峻的挑战,因此如何防治癌症是摆在我们面前的重要任务。

现阶段,对于恶性肿瘤患者来说,手术切除、放疗、化疗依然是基本的治疗方法^[1]。早期的肿瘤治疗多采用手术切除为主,若切除完全,患者有获得长期生存的可能,但切除手术会造成患者机体组织的损伤和气血损耗,使患者体质虚弱,易导致癌症的复发、癌细胞的扩散和转移;中晚期肿瘤多已发生扩散转移,手术切除几率不大,即便手术也仅为局部切除,在临床上多采用化学治疗和放射治疗,但它们在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常细胞以及机体的免疫、骨髓造血等组织功能也有很大损害,因此,放化疗对患者的身体状态要求比较高,很多中晚期身体虚弱的患者无法承受放化疗的痛苦,且真正对放化疗敏感的癌症只占人类全部癌症的10%左右。目前,许多晚期患者多采取手术、放化疗相联合的治疗方法,这种综合治疗方法已经获得肯定,但仍然有很多癌症是不能治愈的,因此,寻找更加理想的治疗方法一直是肿瘤治疗研究的重要课题。近年来,随着人们对肿瘤发生、发展机制的深入研究,随着现代分子生物学和免疫治疗技术的快速发展,科学家提出了肿瘤的生物治疗策略。肿瘤的生物治疗是指通过机体防御机制或生物制剂的作用以调节机体自身的生物学反应,从而抑制或消除肿瘤生长的治疗方式,过去主要在一些免疫原性较强的肿瘤中进行:如黑色素瘤、肾癌、恶性脑胶质瘤等,随着生物治疗研究的发展,现已扩大到对肝癌、肺癌、肠癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌和乳腺癌等的治疗。肿瘤的生物治疗现已成为肿瘤的第四种主要治疗模式,它主要包括^[2]:免疫治疗、分子靶向治疗、基因治疗和干细胞移植治疗等。

1.1 肿瘤的免疫治疗研究

一个世纪前,William Coley首先报道了由细菌毒素引发的机体免疫反应可以诱发肿瘤缩小,从而开启了肿瘤免疫治疗(Cancer Immunotherapy)的研究。肿

瘤免疫治疗的基本理论依据是通过调节或增强机体本来就具有的内在性防御机制(主要为机体对肿瘤细胞的免疫监视和免疫排斥)来控制或杀伤肿瘤细胞,或通过抑制肿瘤细胞转化,促进恶性细胞的分化来降低肿瘤的恶性度。免疫治疗对临床已生长的实体瘤的消除能力还十分有限,因此目前多用作手术、介入等方法的辅助治疗,或不能耐受放化疗以及不能手术切除患者的治疗。免疫治疗策略主要有^[3]:肿瘤主动特异性免疫治疗、非特异性免疫治疗、免疫导向治疗和细胞过继性免疫治疗等。

1.1.1 肿瘤主动特异性免疫治疗

肿瘤主动特异性免疫治疗(active specific immunotherapy)是指利用肿瘤细胞的特异性抗原在体内激发机体产生特异性的免疫,从而达到治疗肿瘤或预防复发的作用,该治疗方法具有以下特点:(1)通过主动免疫能够激发全身性的抗肿瘤效应,与手术、放疗相比,作用范围更加广泛,尤其适用于多发病灶或有广泛转移的恶性肿瘤;(2)主动免疫治疗通过调动机体自身的力量达到抗肿瘤作用,与放化疗相比,副作用小;(3)由于部分肿瘤表达的抗原是自身组织的正常成分,因此用该抗原进行主动免疫可能会打破自身免疫耐受而导致自身免疫性疾病的发生。根据主动免疫所采用的抗原及免疫方式,主要分为以下几种:

1.1.1.1 肿瘤细胞型疫苗

自体肿瘤细胞或异体肿瘤细胞经过物理、化学及生物因素(如:病毒感染、基因转移)等处理,改变或消除其致瘤性,保留其免疫原性,对肿瘤患者进行免疫接种,以激发或增强患者特异性抗肿瘤免疫反应。如:临床试验表明经病毒感染的肿瘤细胞裂解物疫苗(viral oncolysate vaccine,VOV)对高免疫原性肿瘤(如:恶性黑色素瘤)的治疗有很好的效果。Kuang^[4]等用甲醛固定的自体肝癌细胞碎片与粒-巨噬细胞集落刺激因子、IL-2孵育,再与结核菌素一起作为疫苗对41例手术治疗后的 I~IIIa 期肝癌患者进行随机治疗,其中19例患者接受3次(次/2周)疫苗接种治疗,22例患者术后未进行接种治疗作为对照。结果显示:治疗组肝癌复发率较对照组明显降低;治疗组总的生存率较对照组有明显提高。

1.1.1.2 多肽疫苗

应用多肽疫苗(polypeptide vaccine)的目的是在体内将相应的肽装配到 APC 的 MHC 分子上,继而活化初始 T 细胞,诱导细胞毒性 T 细胞的抗肿瘤效应。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库